

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-075598

(43)Date of publication of application : 20.03.1995

(51)Int.Cl.

C12Q 1/68

C12M 1/34

G01N 5/02

G01N 33/50

(21)Application number : 05-221528

(71)Applicant : TERUMO CORP

(22)Date of filing : 07.09.1993

(72)Inventor : YAMAGUCHI HIDEICHIRO
URAGAMI KENICHI

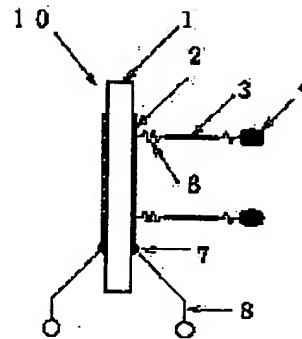
(54) GENE SENSOR AND METHOD FOR DIAGNOSING GENE USING THE SAME

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a sensor for diagnosing existence of mutation of gene in high sensitivity and rapidly and provide a diagnosing method using the sensor.

CONSTITUTION: This gene sensor 10 consists of a quartz oscillator 1, a target diagnosing gene immobilized to the quartz oscillator 1, a hybridizable oligonucleotide 3 and a chemical seed 4 to modify the oligonucleotide 3.

This diagnosing method comprises a process for measuring the vibration frequency of the quartz oscillator using the sensor 10, a process for hybridizing the target diagnosing gene, a process for treating the gene for specifically cleaving a single stranded part, a process for remeasuring the vibration frequency of the quartz oscillator and a process for detecting existence of a mutant gene from the change of the frequency. In the case of the gene to be diagnosed having mutation, when the gene is hybridized, a single stranded part is generated, is treated with an enzyme, a cleft chemical seed is liberated and mass on the quartz oscillator is changed to vary a resonance frequency.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 09.02.2000

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3425193

[Date of registration] 02.05.2003

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-75598

(43) 公開日 平成7年(1995)3月20日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	片内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/68	A	9453-4B		
C 1 2 M 1/34	E			
G 0 1 N 5/02	A	6928-2J		
33/50	P			

審査請求 未請求 請求項の数1 O L (全7頁)

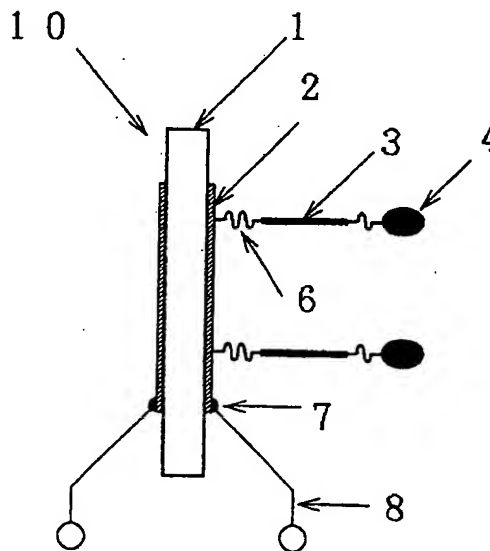
(21) 出願番号	特願平5-221528	(71) 出願人	000109543 テルモ株式会社 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目44番1号
(22) 出願日	平成5年(1993)9月7日	(72) 発明者	山口 秀一郎 神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地 テルモ株式会社内
		(72) 発明者	浦上 研一 神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地 テルモ株式会社内

(54) 【発明の名称】 遺伝子センサおよびそれを用いた遺伝子診断方法

(57) 【要約】

【目的】 本発明は、遺伝子の突然変異の有無を高感度にかつ迅速に診断するセンサおよびそれに用いた診断方法に関する。

【構成】 本発明は、水晶振動子1と、該水晶振動子1に固定化された診断目的遺伝子とハイブリダイズ可能なオリゴヌクレオチド3と、該オリゴヌクレオチド3を修飾する化学種4とから構成される遺伝子センサ10と、このセンサ10を用いた水晶振動子の振動周波数を測定する工程と診断目的遺伝子をハイブリダイズする工程と一本鎖を特異的に切断する酵素を作用させる工程と水晶振動子の周波数を再度測定する工程と周波数の変化から変異遺伝子の存在を検出する工程とからなる診断方法であり、診断する遺伝子に変異があると、ハイブリダイズした時、一本鎖部分が生じ、これに酵素が作用し切断され化学種が遊離し、水晶振動子上の質量の変化が生じ、共振周波数に変化が生じる。



【特許請求の範囲】

水晶振動子と、
該水晶振動子に固定化された診断目的遺伝子とハイブリダイズ可能なオリゴヌクレオチドと、
該オリゴヌクレオチドを修飾する化学種とから構成されることを特徴とする遺伝子センサ。

【請求項 2】水晶振動子と、

該水晶振動子に固定化された診断目的遺伝子とハイブリダイズ可能なオリゴヌクレオチドと、
該オリゴヌクレオチドを修飾する化学種とから構成される遺伝子センサを用いて、
水晶振動子の振動周波数を測定する工程と、
診断目的遺伝子をハイブリダイズする工程と、
一本鎖を特異的に切断する酵素を作用させる工程と、
水晶振動子の周波数を再度測定する工程と、
周波数の変化から変異遺伝子の存在を検出する工程と、
からなることを特徴とする遺伝子診断方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、遺伝子の変異を検出するセンサ及びそのセンサを用いた診断する方法に関する。詳しくは、突然変異の遺伝子を高感度に検出するセンサおよび検出方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

1. 遺伝子変異の検出方法

従来、遺伝子の挿入や欠失等の異常を検査および DNA 診断には、サザンブロッティング(Southern blotting)法や PCR 法を用いて遺伝子の断片の有無や断片の大きさを比較することによって診断している。サザンブロッティング法は、検出感度が高いが、操作が煩雑で長時間かかる問題がある。検出には十分な検体量が必要であり、しばしば PCR 法、LCR 法を用いて増幅される。PCR 法は極めて感度が高いが、コンタミネーション及び操作条件が複雑であるなど問題がある。

【0003】癌や多くの遺伝病では遺伝子の変異は点変異が大半であり、それらに対しては上記の方法は無力で

$$\Delta f = -2 f_0^2 \Delta m / A (\rho_q \mu_q)^{1/2} \dots (1)$$

ここに、 Δf は周波数のシフト、 f_0 はその水晶の基本周波数、 Δm は質量変化、 A は電極の有効面積、 ρ_q は水晶の密度 (2.648 g cm^{-3})、 μ_q はずれ振動定数 (AT カット水晶では $2.947 \times 10^{11} \text{ dyne cm}^{-2}$) である。

【0012】米国特許公報第 4,999,284 号およびジャーナル オブ アメリカン ケミカルソサイエティ (J. Amer. Chem. Soc.)、(1988)、110,8623-8628. においてアールシー エバーソール (R.C. Ebersole) とエム ディ ワード (M.D. Ward) は、水晶振動子に免疫物質を固定化して高感度で測定する方法を開示している。DNA についても言及しているが具体的な手法は示していない。

あり、アレル特異的オリゴヌクレオチド (ASO) のハイブリダイゼーション、アールナーゼ (RNase) A によるプローブ切断法、SSCP (一本鎖 DNA 高次構造) 法、直接塩基配列決定法、その他 (化学修飾法、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法、) などが用いられている。

【0004】① ASO 法は、一塩基対のミスマッチでハイブリッド形成ができなくなることを利用して点突然変異を検出する方法である。

【0005】② RNase A によるプローブ切断法は、RNA をプローブとし、RNA-DNA あるいは RNA-RNA ハイブリッドのミスマッチ箇所では RNase A 反応で切断する方法である。

【0006】③ SSCP 法は、DNA 断片を一本鎖に変性したとき取る高次構造が、一塩基の置換でも変化する変化をポリアクリルアミドゲル電気泳動における移動度の差として検出する方法である。

【0007】④ 直接塩基配列決定法は、単離した DNA 断片の塩基配列をジデオキシシチンターミネーション法で決定することにより塩基置換を知る方法である。

【0008】何れの方法にもそれぞれ検出限界の問題があったり、操作が面倒であったりした。アイソトープを用いる方法もあり、これらは管理区域を設ける必要があり、取扱いが煩雑で、廃棄処理の問題もある。

【0009】(2) QCM

水晶振動子マイクロバラン (Quartz Crystal Microbalance, QCM) を DNA アッセイに用いることが知られている。それらの素子は、水晶板とその両面に形成した電極とから構成される。それら 2 電極は、その水晶板の持つ固有周波数で共振できるように外部共振回路と接続される。その周波数は水晶の質量のみならず水晶と接触している質量や粘性や粘弾性に関係している。

【0010】一般に、共振周波数の変化は水晶と接触している質量の変化と関係付けられている。接触している層および/または物質が剛体として振る舞いと仮定すると、質量変化はサウルベリー (Sauerbrey) の式により求めることができる。

【0011】(G.Z. Sauerbrey, Z. Phys., 155 (1959) 206)

【0013】ジェイ シー アンドル (J.C. Andle) らは、センサ アンド アクチュエータ (Sensors and Actuators) B, 8 (1992) 191-198. において、圧電体板の表面に櫛形電極を形成した、いわゆる SAW デバイスのセンサを用いて DNA を測ることを報告している。DNA の検出感度は、位相 0.5° で質量感度 0.1 ナノグラムであった。

【0014】また、岡畑らは、ジャーナル オブ アメリカン ケミカル ソサイエティ (J. Amer. Chem. Soc.)、(1992)、114,8299-8300. において、水晶振動子の金電極表面に SH 基で修飾した 10mer のオリゴヌクレオチドを固定化してハイブリダイゼーションによる重量変化

を、水晶を発振させて得られる共振周波数変化から測定する方法を示した。

【0015】これらの方法を用いて共振周波数の変化から検出目的のDNAを検出したり、定量的に測定が可能となる。しかしながら、実際のDNA診断や検査として用いるためには、 10^{-18} モル以上の感度が必要である。上述の方法ではDNAの検出感度が0.1から1ナノグラムオーダーであり、感度が低すぎて実用にならない問題があった。また、理想的には一個のDNAから検出できることが望ましい。DNA一個の検出できる方法および装置が渴望されている。サンプルDNAをヒト遺伝子の様な巨大DNAで分子量 10^9 と仮定しても、1分子当たりの質量は、 $(10^9 / (6.02 \times 10^{23})) = 1.7 \times 10^{-15}$ gであり、通常の方法では検出できない。

【0016】また、岡畑らは、吸着によりDNA固定を行っているため不安定さが残っており、精度の向上が困難という問題があった。

【0017】

【発明が解決しようとする問題点】従来の変異遺伝子の診断は、ASO法、RNase法、SSCP法などが使われるが、放射線標識や酵素、蛍光色素標識したプローブをハイブリダイズしたのち電気泳動を行い分子鎖ごとに分離解析する方法であったため、操作が複雑、煩雑、時間がかかるという問題があった。

【0018】一本鎖DNAを用いた遺伝子の検出方法は、変性した一本鎖DNAが不安定という問題がある。DNA一個からの検出ができない問題があった。

【0019】前述のような放射線標識のDNA検査方法にあっては、目的遺伝子を制限酵素で切断し必要部分を増幅したり、放射線標識や酵素、蛍光色素標識したプローブをハイブリダイズしたのち電気泳動を行い分子鎖ごとに分離解析する方法であったため、操作が複雑、煩雑、時間がかかるという問題があった。

【0020】一方、水晶振動子電極法では、簡単なシステムで、その操作は容易であるが、感度が低すぎて実用にならない問題があった。これら原理的な問題を解決するため、超高感度の測定手段の特願平4-238607号に開示している。前述のアレル特異的オリゴヌクレオチド(ASO)のハイブリダイゼーション法を応用して突然変異遺伝子を検出できると考えられるが、点変異検出については具体的に開示されていない。

【0021】本発明は、突然変異遺伝子を検出できる遺伝子診断用センサ及びそのセンサを用いた診断方法を提供することを目的とする。

【0022】

【問題点を解決するための手段】本発明の遺伝子診断用センサは、水晶振動子と、一端を水晶振動子表面に固定し、他端を大きな分子量を持つ化学種で修飾し、診断を行おうとする遺伝子部分と同じ塩基配列を持つ(例えば

プライマー部分とセンス部分を持つ)オリゴヌクレオチドを固定化したものからなる。

【0023】本発明の遺伝子診断方法は、水晶振動子と、該水晶振動子に固定化された診断目的遺伝子とハイブリダイズ可能なオリゴヌクレオチドと、該オリゴヌクレオチドを修飾する化学種とから構成される遺伝子センサを用いて、水晶振動子の振動周波数を測定する工程と、診断目的遺伝子をハイブリダイズする工程と、一本鎖を特異的に切断する酵素を作用させる工程と、水晶振動子の周波数を再度測定する工程と、周波数の変化から変異遺伝子の存在を検出する工程とからなるものである。

【0024】診断目的遺伝子をハイブリダイズすると、診断目的遺伝子に突然変異が存在する場合、ハイブリダイズした時に相補結合が完成しない部分ができ一本鎖の部分が発生することになる。一本鎖DNAを特異的に切断する酵素を作用させると、大きな分子量の化学種を含む遺伝子部分が切断されてため、大きな質量変化が起きる。この質量変化は水晶振動子の共振周波数の変化あるいは、水晶振動子の表面近傍の粘弾性の変化として検出ができる。かくの如く変異遺伝子を高感度に検出できる遺伝子診断方法を提供する。

【0025】図1に本発明の遺伝子センサ10を示す。遺伝子センサ10は遺伝子の診断部位のDNAと同一塩基配列を持つオリゴヌクレオチド3が一端を水晶振動子電極2の表面に固定化され、他端を高分子量の化学種4で化学修飾されている。

【0026】以上のようにして得られた遺伝子センサ10を用いて、変異遺伝子を検出する方法を図2を参照して説明する。

【0027】まず、正常な遺伝子20(a-1)、挿入の変異がある遺伝子21(a-2)、欠失の変異がある遺伝子22(a-3)と点変異のある遺伝子23(a-4)の4種類の遺伝子を遺伝子センサ10のオリゴヌクレオチド3をハイブリダイズさせる。何らかの変異(挿入、欠失、点変異の変異)があると一本鎖の部分24(a-2)、25(a-3)、26(a-4)ができるが、正常な遺伝子では一本鎖の部分はない(a-1)。これらに、一本鎖を特異的に切断する酵素30を作用させると、b-2、b-3、b-4に見られるように、一本鎖があるものは一本鎖の部分から切断される。このために、高分子量の化学種4が取れた状態になる。すると、水晶振動子1の表面の質量が減少し、水晶振動子1の共振周波数が増大する。

【0028】水晶振動子1の発振周波数の上昇は、例えば、図3に示す測定システムによって検知され、測定結果が表示あるいは出力される。水晶振動子1は、発振回路40と接続されることによって水晶振動子固有の(共振)周波数で発振する。発振周波数は、発振回路40で増幅されて周波数カウンタ41により周波数を計測

し、コンピュータ42に送信する。

【0029】そして、遺伝子検出操作の前後の共振周波数の変化を比較し、周波数の上昇データから検出目的遺伝子の存在を判定する。共振周波数の変化の大きさから、予め測定しておいた検量線を用いて検出目的遺伝子の濃度あるいは含有量を算出できる。これらの測定結果は、ディスプレイ装置43、あるいは出力装置44へ送られ表示あるいは印字出力される。

【0030】遺伝子センサ10の質量感度を増大するため電極面積を微小化することができる。(式1から)しかしながら、面積を小さくすることは、電極抵抗を増大することになり、発振回路の負抵抗値よりも大きくなると、もはや前述の発振法では測定できない。このような場合、図4に示すような測定システムを使用することができる。遺伝子センサ10のアドミッタンスの周波数依存性をインピーダンス測定装置50を用いて測定する。測定結果をコンピュータ51に送信する。アドミッタンスの周波数スペクトルをコンダクタンスが最大となる周波数が共振周波数を与えることを利用して、共振周波数を算出することができるので、前述のように検出目的遺伝子の存在を判定したり、同定することができる。

【0031】オリゴヌクレオチド3を修飾している化学種4の質量を検出目的DNA20、21、22、23のそれより大きく、好ましくは水晶振動子1の検出感度の限界以上の質量にしておくと、一分子のレベルでも異常のある遺伝子があれば、変異遺伝子の検出および同定が迅速にかつ容易に行うことができる。

【0032】例えば、その質量が1pg以上である化学種4でオリゴヌクレオチド3を修飾して用い、かつ、質量変化に対する検出限界が1pg以上であるような水晶振動子1を用いると、一分子でも変異のある遺伝子が存在すれば、修飾化学種4を含む部分が外れ、その結果、大きな質量減少となり、これを水晶振動子1で感知されるところとなる。このように遺伝子の変異を1分子レベルで検出できることが理解される。このとき、センサの応答は、外れた切断されたオリゴヌクレオチドの修飾された化学種4の個数に比例するので、デジタル量的に変化する特徴がある。

【0033】遺伝子センサ10に固定化されたオリゴヌクレオチド3は、相補的オリゴヌクレオチド3'と結合させて2本鎖にしておくと、安定に保存できて都合である。使用する前にオリゴヌクレオチド3、3'を解離してから使用することもできるが、検出目的の遺伝子を含む被検液に遺伝子センサ10を接触させ、検出目的の遺伝子20~23が遺伝子センサ10に結合し易いように、相補結合を形成している水素結合を弱めるために加熱したり、および/または、電解質を添加したりすることにより、ヌクレオチド対および検出目的の遺伝子20~23の相補結合が解離させる。その後、温度を徐々に下げてアニールすることでオリゴヌクレオチド3と検出

目的の遺伝子20~23とが結合する。一本鎖を特異的に切断する酵素30を作用させると一本鎖があるものは一本鎖の部分から切断される。このために、高分子量の化学種4が取れた状態になる。水晶振動子1の表面の質量が減少し、水晶振動子1の発振周波数が上昇する。この周波数上昇によって被検液中の検出目的の遺伝子21~23の存在が確認される。同時に電極2表面への非特異的物質の吸着も起こるが、これら発振周波数を低下する方向に作用するので、本発明の遺伝子センサ10は非常に選択性の高いものとなる。

【0034】

【実施例】以下、本発明の実施例を示しながら、本発明を詳細に説明する。

【0035】

【実施例1】図1に遺伝子センサ10の構造を示す。

【0036】水晶基板1の両面には、発振起用の直径5mmの金円板電極2が形成されている。

【0037】金電極2の表面には、一端が化学種4で修飾されたオリゴヌクレオチド3がシラン化合物6を介して固定化されている。

【0038】水晶振動子基板1は、直径12mm、厚さ0.33mmのATカットの水晶円板を用い、高周波スパッタ装置(日電アネルバ社製SPF-210H)を用いて金電極2を形成した。

【0039】水晶基板1とシランカップリング剤(γ -グリシドキシプロピルシラン、SH6040、東レ・ダウコーニング・シリコン(株))を容れた容器と一緒に真空チャンバーに入れて減圧下で2時間吸着したのち、常圧下で150℃、30分間加熱して反応させることによってシラン化合物6を形成した。

【0040】オリゴヌクレオチド3は、DNA/RNA SYNTHESIZERS 392型(Applied Biosystems Inc.社製)のDNAシンセサイザーをもちいてポリスチレン(PS)微粒子上の化学種を出発点にして合成したことによって、修飾化学種としてポリスチレン微粒子を末端に持つオリゴヌクレオチド鎖3を調製した。

【0041】次に、水溶性カルボジイミドを用いて水晶振動子表面に固定化されたシラン化合物6のOH基を活性化した後、該ヌクレオチド3と反応させて水晶基板の表面に固定した。

【0042】このようにして作製した遺伝子センサ10を図3に示す測定装置を用いて乾燥空気中で共振周波数を測定した。共振周波数は、オリゴヌクレオチド3とPS4を固定しないとき5002201Hzであり、固定化したときには、5001906Hzであった。予め、共振周波数と質量との関係を測定することによって、質量感度は理論値に近い3.4ng/Hzが得られている。したがって、オリゴヌクレオチドとPSの固定化量は、 $(5001906 - 5002201) \times (-3.4) = 1000$ [ng]と分かった。平均0.5pgのポリスチレン粒子

を用いたので、約 2×10^6 個が固定化されたことが分かった。

【0043】

【実施例2】実施例1で作成した遺伝子センサの表面に、正常な遺伝子を全量で 1×10^5 分子含む試料溶液 $100 \mu\text{l}$ を接触させて、溶液温度を 93°C で1分間保持したのち、ゆっくり降温しながらアニールを行いハイブリダイズした。洗浄、乾燥後、S1ヌクレアーゼを1ユニット/ μl 含む酵素液30を加えて10分間 4°C で反応させた。十分に水洗浄した後、燥空气中で発振周波数を測定すると、 5001906Hz であった。質量変化がないことが分かり、正常遺伝子の場合、質量の変化がないことが確認された。

【0044】

【実施例3】次に挿入タイプの変異遺伝子を全量で 1×10^5 分子含む試料溶液 $100 \mu\text{l}$ に接触させて、実施例2と同様にしてハイブリダイズさせた後、S1ヌクレアーゼで処理すると、共振周波数は、 15Hz の上昇が観測された。質量としては $15 \times 3.4 = 51\text{ng}$ が減少し、分子数としては約 1×10^5 と算出できる。試料中の遺伝子のほぼ全量が反応に預かったと考えられ、変異のある遺伝子を検出することができた。

【0045】

【実施例4】点変異タイプの変異遺伝子を全量で 5×10^4 分子含む試料溶液 $100 \mu\text{l}$ を実施例1の遺伝子センサに接触させて、実施例1と同様にしてハイブリダイズさせた後、S1ヌクレアーゼで処理すると、共振周波数は、 7Hz の上昇が観測された。質量としては $7 \times 3.4 = 23.8\text{ng}$ が減少し、分子数としては約 5×10^4 と算出できる。試料中の遺伝子のほぼ全量が反応に預かったと考えられ、変異のある遺伝子を検出することができた。

【0046】

【実施例5】基本周波数が 2.5MHz である直径 4mm の水晶板に直径 0.5mm の金電極形成したのち実施例1と同様にして遺伝子センサを作製した。

【0047】共振周波数の変化を測定するのに図4に示すようなインピーダンスアナライザー (HP4194A) を用いてコンダクタンス最大周波数から求めた以外は実施例1と同様にして測定した。DNAを固定化しないときの質量感度は $1.1\text{pg}/\text{Hz}$ であった。

【0048】実施例3と同様にして変異遺伝子を含む試料で測定した結果、試料DNA分子2個からの変異遺伝子があれば検出が可能であることが分かった。

【0049】

【発明の効果】以上の説明から明らかなように、本発明は、放射標識や酵素等を用いないので取扱いが簡単かつ、安全である。また、操作が簡単である。従来法に比較して迅速測定が可能である。

【0050】本発明によれば、正常遺伝子の一部の配列が分かれば数個のレベルから突然変異を起こした遺伝子DNAを検出することが可能である。遺伝子レベルでの異常 (点変異、欠失、挿入) を検出することができ、遺伝子レベルの病因の診断や治療に貢献できる。

【0051】そして、癌遺伝子や癌抑制遺伝子を効率よく検出できるので、再発や発症の予防が可能になる。

【0052】本発明遺伝子センサを複数配列して形成することで同時に多種類検査ができることは自明のことである。ハイリスク群のスクリーニング検査に好適である。

【図面の簡単な説明】

図1は、本発明の1実施例による遺伝子センサの断面構造を示す。

図2は、本発明の変異遺伝子の検出原理を説明する図である。

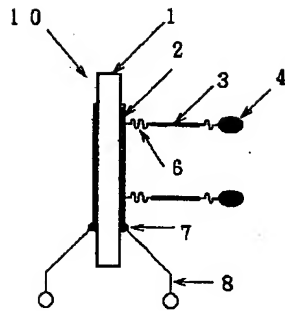
図3は、水晶振動子の発振周波数の上昇を検知する測定システムのブロック図である。

図4は、共振周波数の変化を測定するためのシステムのブロック図である。

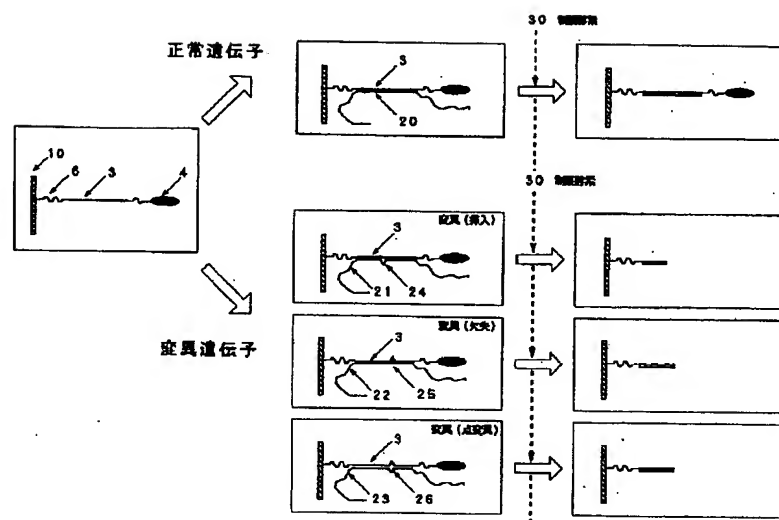
【符号の説明】

- 1：水晶振動子
- 2：電極
- 3：オリゴヌクレオチド
- 4：高分子量の化学種
- 6：シラン化合物
- 10：遺伝子センサ
- 20：正常遺伝子
- 21：挿入の変異がある遺伝子
- 22：欠失の変異がある遺伝子
- 23：点変異のある遺伝子
- 30：酵素液
- 40：発振回路
- 41：周波数カウンタ
- 42, 51：コンピュータ
- 43：ディスプレイ装置
- 44：出力装置
- 50：インピーダンス測定装置

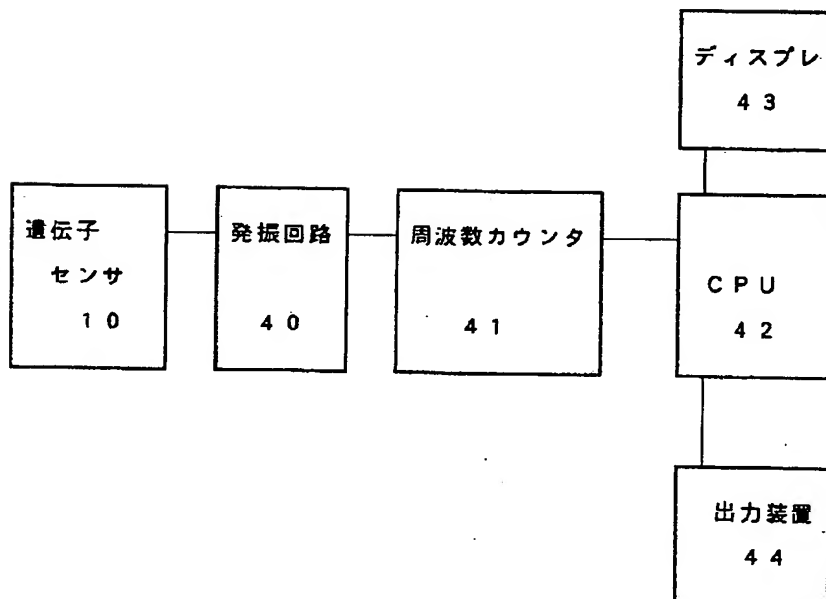
【図1】



【図2】



【図3】



【図4】

